

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP00/08193

47

13. Sep. 2000

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 09 OCT 2000	
WIPO	PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

EP 00/08193

**Aktenzeichen:** 100 16 073.5

**Anmeldetag:** 31. März 2000

**Anmelder/Inhaber:** Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie  
(EMBL), Heidelberg, Neckar/DE

**Bezeichnung:** Immobilisierung und Markierung von Biopolymeren

**Priorität:** 24.08.1999 DE 199 40 077.6

**IPC:** C 07 B, C 07 H, B 01 J

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. August 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
im Auftrag

AGL

## Immobilisierung und Markierung von Biopolymeren

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren, insbesondere von Nukleinsäuren, an eine Festphase. Dabei können kovalente Bindungen zwischen primären oder/und sekundären Amingruppen der Biopolymere und mit Amingruppen reaktiven Gruppen der Festphase geschlossen werden. Alternativ können die Biopolymere auch durch nichtkovalente Wechselwirkungen an die Festphase gebunden werden.

10

15

Die Bindung von Nukleinsäuren an die Oberfläche von Festphasen ist ein sehr kritischer Schritt bei der Herstellung von Biochips. Ein derzeit angewandtes Standardverfahren beinhaltet die Verwendung von mit Polylysin beschichteten Oberflächen, auf denen DNA über Adsorptionswechselwirkungen immobilisiert wird, wobei die Bindeeffizienz durch zusätzliche UV-Quervernetzung erhöht wird. Dieses Verfahren hat jedoch erhebliche Nachteile hinsichtlich der Wiederverwendbarkeit der

20

Chips, der Bindekapazität, der Beschränkung auf lange DNA-Fragmente, der Beschädigung von DNA, z.B. durch Abspaltung von Purinbasen unter Bildung von Photodimeren, der Ablösung von Verbindungen und des Signalhintergrunds aufgrund unspezifischer Bindungen an die Oberfläche während der Hybridisierung.

25

Es besteht daher ein Bedürfnis, eine wirksame und einfache Methode zur Bindung von Biopolymeren, insbesondere DNA und Oligonukleotiden beliebiger Länge, an Festphasen bereitzustellen, um die oben genannten Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise zu überwinden.

30

Gemäß vorliegender Erfindung wird ein neues Verfahren zur Herstellung von Biochips, insbesondere Nukleinsäurechips bereitgestellt, das auf einer

Bindung von Biopolymeren an eine Festphase beruht. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens werden Nukleinsäuren immobilisiert, die an ihrem 5'-Ende eine Aminogruppe tragen und die durch enzymatischen Einbau von 5'-aminomodifizierten Nukleosidbausteinen in Nukleinsäuren und anschließende ortsspezifische Spaltung der Nukleinsäuren erhältlich sind. Dieses Verfahren ist detailliert in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP99/02320 beschrieben, auf die in diesem Zusammenhang ausdrücklich verwiesen wird.

Ein erster Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen Festphasen, die auf mindestens einem Teil ihrer Oberfläche Gruppen, die mit Aminogruppen eine Reaktion eingehen können, ausgewählt aus Halogenid-, Aldehyd-, Epoxid-, Isocyanat- und Isothiocyanatgruppen, enthält,

(b) Bereitstellen eines Biopolymers mit einer reaktiven Aminogruppe und

(c) kovalentes Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase, wobei die reaktive Aminogruppe des Biopolymers, bei der es sich vorzugsweise um eine primäre oder/und sekundäre Aminogruppe handelt, mit einer reaktiven Gruppe der Festphase eine kovalente Bindung ausbildet.

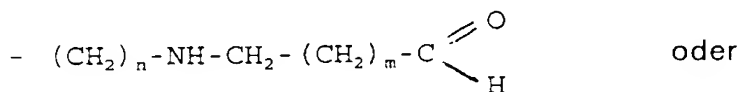
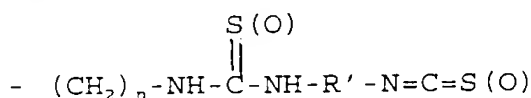
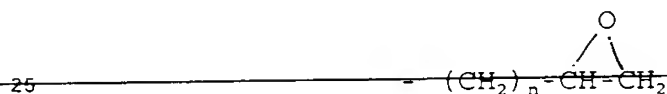
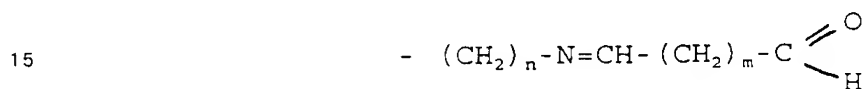
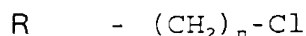
Die mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der Festphase werden ausgewählt aus Halogenidgruppen, insbesondere Alkyl- oder/und Arylhalogenidgruppen, Aldehydgruppen, Epoxidgruppen, Isocyanatgruppen und Isothiocyanatgruppen, wobei Arylhalogenid-, Aldehyd- und Isocyanatgruppen bevorzugt sind. Diese reaktiven Gruppen werden durch Modifizierung der Festphase erzeugt. Die Festphase wird wiederum vorzugsweise ausgewählt aus

Materialien auf Siliciumbasis, beispielsweise Silicium, Siliciumdioxid, Silicatgläsern oder Silicium/Siliciumdioxid.

Die in Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellte  
5 aktivierte Festphase umfaßt vorzugsweise eine Struktur der allgemeinen Formel (I):



10 worin Z Silicium, Siliciumdioxid, ein Silicatglas oder eine oxidierte Siliciumschicht bedeutet,



bedeutet,

R' einen Alkylen- oder Arylenrest, insbesondere einen 1,4-Phenylrest  
40 bedeutet, und

n und m jeweils eine positive ganze Zahl vorzugsweise von 1 bis 20 bedeuten.

Die zu immobilisierenden Biopolymere werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleinsäuren, beispielsweise DNA-Molekülen, RNA-Molekülen oder/und Oligonukleotiden, und Nukleinsäureanaloga wie beispielsweise peptidischen Nukleinsäuren (PNA).

5

Besonders bevorzugt werden aminomodifizierte Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloga mit einer Struktur der allgemeinen Formel (II) an die Festphase immobilisiert:



worin

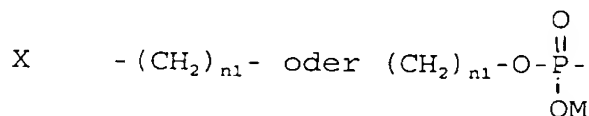
- $\text{R}^1$  Wasserstoff oder eine  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkylgruppe bedeutet,  
 $\text{NS}$  eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA oder ein Oligonukleotid,  
15 oder ein Nukleinsäureanalogon bedeutet,  
 $\text{X}$  eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe bedeutet und  $\text{X}$  mit dem 5'- oder/und 3'-terminalen Baustein von  $\text{NS}$  verknüpft ist.

Besonders bevorzugt bedeutet  $\text{NS}$  eine Nukleinsäure und die Gruppe  $\text{R}^1\text{NH-X}$

20

ist über das 5'-C-Atom des 5'-terminalen Zuckerrest, bei dem es sich insbesondere um einen Deoxyribose- oder Ribose-Residuum handelt, mit  $\text{NS}$  verknüpft.  $\text{X}$  wiederum bedeutet vorzugsweise

25



worin

- $n1$  eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20, z.B. 3, 6 oder 12 bedeutet und  
 $\text{M}$  Wasserstoff oder ein Kation bedeutet.

30

Die 5'-aminomodifizierten Nukleinsäuren können - wie in PCT/EP99/02320 beschrieben - durch enzymatischen Einbau von 5'-aminomodifizierten

Nukleotidbausteinen in Nukleinsäuren und anschließende ortsspezifische Spaltung an der Aminogruppe erzeugt werden. Der enzymatische Einbau kann unter Verwendung von Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, RNA-abhängigen RNA-Polymerasen und Terminalen Transferasen erfolgen. Besonders bevorzugt ist die T7 DNA-Polymerase oder verwandte Enzyme wie die T3 oder die SP6 DNA-Polymerase oder Modifikationen dieser Enzyme.

Die ortsspezifische Spaltung an der Aminogruppe kann durch Temperaturerhöhung, z.B. auf mindestens 37°C, Einstellung saurer Bedingungen, z.B.  $\text{pH} \leq 5$ , Mikrowellenbehandlung, Laserbehandlung, z.B. mit einem Infrarotlaser oder/und 3'-seitig des die 5'-Aminogruppe enthaltenden Nukleotids durch enzymatischen Verdau, beispielsweise mit Exo- oder Endonukleasen oder Phosphodiesterasen, z.B. 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase erfolgen.

Ebenso denkbar ist jedoch auch eine Verknüpfung von X mit dem 3'-terminalen Baustein von NS.

20

Die Immobilisierung der aminofunktionalen Biopolymere auf der Festphase erfolgt vorzugsweise unter alkalischen Bedingungen, z.B. bei einem pH-Wert von 9 bis 11. Die Biopolymere werden in einer Lösung, günstigerweise in Konzentrationen von 0,1 bis 100  $\mu\text{M}$ , insbesondere 2 bis 50  $\mu\text{M}$  mit der zu beschichtenden Festphase in Kontakt gebracht. Eine zu beschichtende Fläche hat eine Größe von vorzugsweise 0,1 bis 100  $\text{mm}^2$ , wobei in vielen Fällen mehrere Flächen auf einer Festphase mit gleichen oder unterschiedlichen Biopolymeren beschichtet werden. Nach dem Beschichten, z.B. durch Aufspotten, wird die Festphase getrocknet und anschließend in einem wässrigen Medium bei erhöhter Temperatur, z.B.  $\geq 40^\circ\text{C}$  inkubiert. Auf diese Weise können beschichtete Festphasen erhalten

30

werden, die eine Bindekapazität von bis zu einigen 100 fmol des Biopolymers, z.B. eines Oligonukleotids, pro mm<sup>2</sup> besitzen.

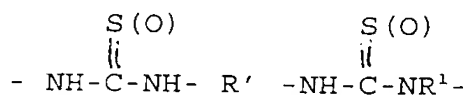
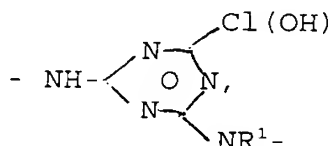
Bei der Festphase kann es sich um einen Biochip handeln, der gegebenenfalls mehrere mit Nukleinsäuren belegte definierte Flächen in Form von Array-Anordnungen enthält. Vorzugsweise weist die Festphase eine Struktur der allgemeinen Formel (III) auf:



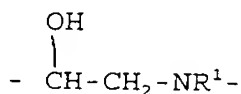
worin Z die Festphase bedeutet,

$R^2$  -  $(CH_2)_{n2}$ - bedeutet,

Y -  $N=CH-(CH_2)_m-CH=N-$ ,  
 -  $NH-CH_2-(CH_2)_m-CH_2-NR^1-$ ,  
 -  $NR^1-$ ,



oder



bedeutet,  $R'$ ,  $R^1$ , NS und X wie zuvor definiert sind,

$n2$  eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20, z.B. 1, 3, 6 oder 12 bedeutet, und

m wie zuvor definiert ist.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase mit immobilisierten Biopolymeren umfassend eine Struktur der allgemeinen Formel (III) und die Verwendung der Festphase zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den immobilisierten Biopolymeren und freien Biopolymeren, die vorzugsweise aus biologischen Proben stammen und beispielsweise aus Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, Peptiden, Polypeptiden, Lipiden und Kohlenhydraten ausgewählt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden als freie Biopolymere Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäureanaloga verwendet, die 5'-aminomodifizierte Nukleotidbausteine wie in PCT/EP99/02320 beschrieben enthalten. Aufgrund der Labilität der P-N-Bindung in diesen Nukleinsäuren gegenüber Temperaturerhöhung, sauren Bedingungen, Mikrowellenbehandlung, Laserbehandlung oder/und enzymatischem Verdau kann nach Beendigung der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den immobilisierten Biopolymeren und den modifizierten freien Biopolymeren ein selektiver Abbau der freien Biopolymere erfolgen. Dies ist insbesondere bei Verwendung von längeren Nukleinsäurefragmenten als immobilisierten Biopolymeren und freien Biopolymeren von Bedeutung, bei denen die Länge

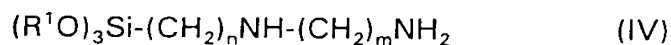
doppelsträngiger Hybridisierungsbereiche größer als 100 Basen und besonders bevorzugt größer als 200 Basen, z.B. 500 bis 2000 Basen, sein kann. Bei derartig langen Hybridisierungsbereichen ist die Ablösung von freien Biopolymeren nach Beendigung der Untersuchung üblicherweise nur unter relativ drastischen Bedingungen möglich, wodurch eine Wiederverwendung der immobilisierten Biopolymere für eine Rehybridisierung erschwert wird. Diese Schwierigkeiten können bei Verwendung von Nukleinsäuren mit 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteinen als Biopolymere beseitigt werden. In diesem Fall muß als immobilisiertes Biopolymer eine nicht-modifizierte Nukleinsäure eingesetzt werden.



Ein zweiter Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur kovalenten oder nichtkovalenten Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase umfassend die Schritte:

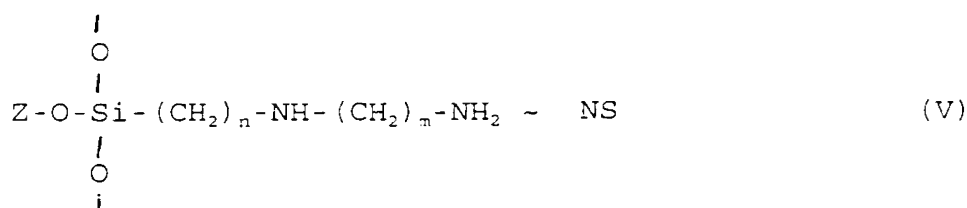
- 5 (a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen Festphasen, die mindestens auf einem Teil ihrer Oberfläche Aminogruppen enthält,
- (b) Bereitstellen eines Biopolymers und
- (c) Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase, wobei die Aminogruppen enthaltende Festphase stabile kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Biopolymer, insbesondere einer Nukleinsäure, beispielsweise einer unmodifizierten Nukleinsäure oder einer aminomodifizierten Nukleinsäure (wie zuvor beschrieben) ausbildet.

15 Die Aminogruppen der Festphase werden vorzugsweise durch Behandlung der Festphasenoberfläche mit einer Aminosilylverbindung erzeugt. Diese Aminosilylverbindung weist vorzugsweise eine Struktur der allgemeinen Formel IV auf:



wobei  $R^1$  Wasserstoff oder eine  $C_1$ - $C_3$ -Alkylgruppe, vorzugsweise einen Methylrest, bedeutet und  $n$  und  $m$  wie zuvor definiert sind. Besonders  
25 bevorzugt ist die Verbindung der Formel (IV) N-(6-Aminohexyl)-aminopropyltrimethoxysilan.

Durch Bindung von Biopolymeren wird eine Festphase erhalten, beispielsweise ein Biochip, der gegebenenfalls mehrere mit Nukleinsäuren  
30 belegte definierte Flächen in Form von Array-Anordnungen enthält. Vorzugsweise weist die Festphase eine Struktur der allgemeinen Formel (V) auf:



wobei NS, Z, n und m wie vorstehend definiert sind und  $\sim$  eine kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkung darstellt.

Die zu immobilisierenden Biopolymere werden vorzugsweise mittels Mikroinjektionspipetten auf der Festphase aufgebracht. Diese Mikroinjektionspipetten sind beispielsweise Glaskapillaren, die an ihrer Öffnung einen Durchmesser von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 1 mm, vorzugsweise 0,5  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  aufweisen. Mittels dieser Mikroinjektionspipetten können extrem kleine Flächenbereiche mit immobilisierten Biopolymeren auf der Oberfläche erzeugt werden, was zu einer erheblichen Vergrößerung der Array-Dichte auf der Festphase führt. Der Durchmesser einzelner Flächenbereiche auf der Festphase beträgt vorzugsweise 0,5 bis 10  $\mu\text{m}$ , beispielsweise etwa 3  $\mu\text{m}$ , während im Stand der Technik üblicherweise nur Durchmesser von etwa 100  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Die Verbesserung der Array-Dichte, die durch Verwendung von Mikroinjektionspipetten erreicht wird, ist insbesondere für

Festphasen mit Strukturen der allgemeinen Formeln (III) und (V) von Bedeutung. Es werden jedoch auch bei Array-Strukturen, die auf andere Weise hergestellt wurden, Verbesserungen erzielt.

Vorzugsweise werden auf Hybridisierung basierende Wechselwirkungen der immobilisierten Biopolymere mit freien Biopolymeren untersucht. Um eine optimale Hybridisierung zu erreichen, erfolgt nach dem Inkontaktbringen der beschichteten Festphase mit den freien Biopolymeren zunächst eine Denaturierung bei erhöhter Temperatur und dann eine Inkubation bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur für eine ausreichende Zeitdauer und unter Verwendung eines geeigneten Hybridisierungspuffers. Bevorzugte Bedingungen für die Hybridisierung insbesondere von cDNA-Molekülen an immobilisierte Oligonukleotide sind eine Hybridisierungstemperatur von 2 bis

10°C, eine Hybridisierungsdauer von mindestens 4 h und ein Hybridisierungspuffer, der 1 bis 50 mM divalente Metallionen, insbesondere Magnesiumionen bei einem pH-Wert von 7 bis 9 enthält. Die Konzentration der freien Biopolymere, z.B. cDNA-Moleküle beträgt vorzugsweise 0,1 bis 10  $\mu$ M. Nach der Hybridisierung wird bei einer für die jeweils gewünschte Stringenz ausreichenden Temperatur (siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press) gewaschen.

Die Festphase kann beispielsweise zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, für Untersuchungen der Expression von Genen, der Funktion von Genen und des Metabolismus eingesetzt werden. Weitere Anwendungen der Festphase sind das Auffinden neuer Wirkstoffe und Medikamente bzw. deren Wirkung und gegebenenfalls Nebenwirkungen, der Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel und die Detektion von Mutationen.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen von auf einer Hybridisierung basierenden Wechselwirkungen von immobilisierten und freien Biopolymeren, umfassend

eine erfindungsgemäße Festphase, mindestens eine markierte Hybridisierungssonde, einen geeigneten Hybridisierungspuffer und eine Hybridisierungskammer gegebenenfalls verbunden mit einer Pumpvorrichtung und einer Temperaturkontrollvorrichtung. Die Vorrichtung kann zum Nachweis der Bindung von markierten Hybridisierungssonden an immobilisierte Biopolymere verwendet werden. Gebundene Hybridisierungssonden können von der Festphase ohne Verlust immobilisierter Biopolymere abgelöst werden, wodurch der Einsatz der Vorrichtung für einen oder mehrere weitere Hybridisierungszyklen ermöglicht wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als Hybridisierungssonde ein Gemisch mehrerer unterschiedlicher cDNA-Moleküle verwendet. Dieses cDNA-Molekülgemisch ist erhältlich durch ein Verfahren das die gleichzeitige

Amplifikation und Markierung von cDNA-Molekülen beinhaltet und die Schritte umfaßt:

- (a) Bereitstellen von RNA-Molekülen, vorzugsweise eine Population unterschiedlicher RNA-Moleküle, z.B. Gesamt-RNA, mRNA oder andere RNA-Fractionen aus einer biologischen Probe,
- (b) Reverses Transkribieren der RNA-Moleküle unter Verwendung geeigneter Primer ohne Einführung von Markierungsgruppen in die resultierenden cDNA Moleküle,
- (c) gleichzeitiges Markieren und Amplifizieren der cDNA Moleküle unter Verwendung eines oder mehrerer markierter Deoxyribonukleosidtriphosphate und
- (d) gegebenenfalls Aufreinigen der resultierenden cDNA Moleküle.

Die Reverse Transkription wird vorzugsweise durch Poly-dT-Priming durchgeführt, wobei ein Poly-dT-Primer, der zusätzlich einen Abschnitt einer kodierenden Region enthält, unter Bedingungen verwendet wird, bei denen zusätzliche Nukleoside an das 3'-Ende der revers transkribierten cDNA angefügt werden (z.B. die Superscript II Reverse Transkriptase von GIBCO/Life Technologies, die 3 C-Reste anfügen kann) und eines

entsprechenden komplementären Oligonukleotids (z.B. eines SMART-Oligonukleotids mit einer 5'-GGG-Region von Clontech). Die Amplifikation erfolgt vorzugsweise mittels PCR, wobei ein zur kodierenden Region komplementärer Primer und eine Nukleosidtriphosphatmischung, die ein oder mehrere markierte Triphosphate enthält, verwendet wird. Die Markierung kann eine radioaktive Markierungsgruppe sein. Bevorzugt sind jedoch Fluoreszenzgruppen wie etwa Fluorescein, CY5 und CY3.

Die Einführung der Markierungsgruppen während des Amplifikationsschritts hat den Vorteil, daß größere Mengen markierter Sonden erhalten werden. Weitere Vorteile dieser Prozedur sind eine höhere Signaldynamik während der Messung und die Möglichkeit, unterschiedliche Markierungsgruppen zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zusätzlich während des Amplifikationsschrittes 5'-aminomodifizierte Nukleotide wie in PCT/EP99/02320 beschrieben als Bausteine für die enzymatische Synthese der Amplifikationsprodukte verwendet. Die auf diese Weise hergestellten Amplifikationsprodukte enthalten labile P-N-Bindungen, die unter definierten Bedingungen (siehe oben) gespalten werden können. So wird nach Beendigung des Hybridisierungsexperiments das Ablösen markierter Hybridisierungssonden von der Festphase erleichtert, wodurch eine weitere Erhöhung der Anzahl von möglichen Rehybridisierungszyklen für die Festphase erreicht wird.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren aufgrund ihrer Basensequenz, wobei einer der die doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente bildenden Nukleinsäurestränge mindestens einen 5'-aminomodifizierten Nukleotidbaustein enthält.

Die Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren aufgrund ihrer Basensequenz erlaubt die Unterscheidung von im wesentlichen gleich langen

Nukleinsäurefragmenten, die sich nur durch ihre Basensequenz unterscheiden. Bei einer derartigen Auftrennung erfolgt ein zumindest partielles Aufschmelzen der Nukleinsäuredoppelstränge beispielsweise durch einen Temperaturgradienten oder einen Gradienten von Denaturierungsmittel. Das Ausmaß dieses Aufschmelzens wird bei gegebenen Bedingungen durch die Stärke der Basenpaarung zwischen den beiden Nukleinsäuren bestimmt und ist somit von der spezifischen Nukleinsäuresequenz abhängig. Derartige Verfahren werden beispielsweise zur Mutationsanalyse, z.B. zur Analyse von Punktmutationen, verwendet. Bei Einbau von 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteinen in einen der beiden Nukleinsäurestränge, z.B. durch Verwendung entsprechender Primer, kann - bei entsprechender Temperaturerhöhung - eine ortsspezifische Spaltung des modifizierten Nukleinsäurestranges an einer jeweils gewünschten Position erfolgen. Vorzugsweise

werden die 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteine an derjenigen Position bzw. denjenigen Positionen eingebaut, wo eine Mutation vermutet wird. Eine während der Auftrennung durch eine entsprechende Matrix, z.B. ein Gelmedium oder eine flüssigkeitschromatographische Trennmatrix, bei Einstellung entsprechender Temperaturbedingungen erfolgende Spaltung der P-N-Bindung am 5'-aminomodifizierten Nukleotidbaustein führt zu einer signifikanten Verbesserung des Auftrennungsverhaltens und somit zu einer besseren Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Nukleinsäurefragmenten gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz.

Der ortsspezifische Einbau von 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteinen erfolgt vorzugsweise durch Auswahl von Kombinationen geeigneter Primer und 5'-aminomodifizierten Nukleosidtriphosphaten und Erzeugen eines modifizierten Komplementärstrangs durch Primerextension.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert werden.

## Beispiele

### 1. Herstellung einer aktivierten Festphase unter Verwendung von aromatischen trisubstituierten Aminen

#### 1.1 Derivatisierung von Glasoberflächen

Standard-Objektträger (Menzel) wurden mit konzentrierter Chromschwefelsäure bei Raumtemperatur für 1 h gereinigt und danach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur in 65 %ige Salpetersäure gegeben und danach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur in halbkonzentrierte Salzsäure gegeben und danach wieder mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

Nach Trocknung wurden die Objektträger mit 1 % Trimethoxy-3-amino-propylsilan in wasserfreiem Toluol oder Dichlormethan oder in Methanol:Wasser (1:1) für 3 h bei Raumtemperatur behandelt und danach 3 h bei 110°C getrocknet.

5

Derivatisierte Objektträger des Typs CSA100 (CEL Associates, Texas, USA) können für die meisten Anwendungen ebenfalls eingesetzt werden.

## 1.2 Aktivierung der Oberflächen

10

15

2 g Cyanurchlorid wurden in 20 ml trockenem Aceton gelöst und zu 180 ml trockenem N,N-Dimethylformamid (DMF) gegeben. Anschließend wurden 500 µl N,N-Diisopropylethylamin zugesetzt. Die gemäß 1.1 hergestellten Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 30 min in diese Lösung gegeben und anschließend 2 min mit DMF und 2 min mit Aceton gewaschen. Nach Trocknung sollten die Objektträger sofort verwendet werden.

## 2. Herstellung einer aktivierten Festphase unter Verwendung von Dialdehyden

20

### 2.1 Derivatisierung von Glasoberflächen

Standard-Objektträger (Menzel) wurden wie unter 1.1 beschrieben mit Chromschwefelsäure, Salpetersäure und Salzsäure gereinigt und anschließend getrocknet.

25

### 2.2. Aktivierung der Oberflächen

Die Objektträger wurden in eine 25%ige Lösung von Glutardialdehyd in bidestilliertem Wasser gegeben und dort für 24 h stehen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger aus der Lösung entnommen und mit bidestilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

30

### 3. Herstellung einer aktivierten Festphase unter Verwendung von Isocyanaten

#### 3.1 Derivatisierung von Glasoberflächen

5 Standard-Objektträger (Menzel) wurden wie unter 1.1 beschrieben mit Chromschwefelsäure, Salpetersäure und Salzsäure gereinigt und anschließend getrocknet.

#### 3.2 Aktivierung der Oberflächen

Die Objektträger wurden mit 1% 3-Isocyanato-propyl-dimethylchlorsilan in wasserfreiem Toluol für 3 h bei Raumtemperatur in Kontakt gebracht und anschließend getrocknet.

### 15 4. Kovalente Bindung von DNA an aktivierte Glasoberflächen

5'-(C<sub>6</sub>)-aminomodifizierte oder 5'-(C<sub>12</sub>)-aminomodifizierte Oligonukleotide wurden manuell unter Verwendung einer Standardpipette auf die aktivierten Oberflächen aufgespottet. Zum Aufspotten wurden 0,1 M Natriumcarbonat  
20 pH 10 mit einer Oligonukleotid-Konzentration zwischen 2 bis 50 µM verwendet. Es wurden Volumina von etwa 0,05 µl auf eine Oberfläche von etwa 1 mm<sup>2</sup> aufgebracht.

Die aufgespotteten Oligonukleotide wurden getrocknet und dann in eine mit  
25 destilliertem Wasser gefüllte Hybridisierungskammer gegeben und dort bei 50°C für etwa 1 bis 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in Wasser oder Pufferlösung gewaschen und getrocknet.



## 5. Charakterisierung der Bindung von immobilisierten Nukleinsäuren an die Festphase

Die Stabilität der kovalenten Bindung von 5'-(C<sub>6</sub>)-aminomodifizierten oder 5'-(C<sub>12</sub>)-aminomodifizierten Oligonukleotiden an die Festphase wurde getestet. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die am 3'-Ende mit Fluorescein oder CY5 markiert waren. Die an die aktivierte Oberfläche gebundenen Oligonukleotide wurden in Wasser oder Hybridisierungspuffer bei erhöhten Temperaturen für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert.

Die Stabilität der kovalenten Immobilisierung wurde über das Integral des Fluoreszenzsignals bestimmt. Die Menge gebundener Oligonukleotide wurde durch Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt, die durch Fluoreszenzscanning bekannten Mengen an Molekülen aufgezeichnet wurde.

Die Ergebnisse für die Stabilität der kovalenten Bindung sind in der folgenden Tabelle gezeigt:

Zeit	0	30	90	150	210
T = 90°C	90,7	96,0	88,4	102,4	102,4
T = 85°C	87,1	101,8	91,8	95,3	92,4
T = 80°C	99,9	103,8	97,8	103,5	102,5

Es ist ersichtlich, daß selbst nach längerer Inkubation bei erhöhter Temperatur keine signifikante Ablösung der immobilisierte Oligonukleotide erfolgt.

Die Bindekapazität der Festphase beträgt bis zu einigen 100 fmol Oligonukleotid/mm<sup>2</sup>.

## 6. Herstellung modifizierter PCR-Produkte

Eine PCR wurde unter Verwendung 5'-(C<sub>6</sub>)-aminomodifizierter oder 5'-(C<sub>12</sub>)-aminomodifizierter Primer durchgeführt. Die Herstellung dieser Primer erfolgte durch chemische Synthese nach "Standard-Amidit-Chemie" aus kommerziell erhältlichen Synthesebausteinen. Als Primer wurden sowohl Standardprimer als auch genspezifische Primer verwendet. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die resultierenden modifizierten PCR-Produkte wurden wie unter Punkt 4 beschrieben an einer Festphase immobilisiert.

## 7. Simultane Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung von cDNA-Pools mit unbekannten Sequenzen

Anstelle der Einführung von Fluoreszenzmarkierungen während der Reversen Transkription wurde die RNA zunächst in cDNA revers transkribiert und anschließend in einem zweiten Schritt simultan markiert und amplifiziert.

Die Reverse Transkription (RT) wurde gemäß der im SMART PCR cDNA-Synthesekit (Clontech, Produktbroschüre Seite 19) durchgeführt.

Eine typische Prozedur ist nachfolgend angegeben.

Komponenten des Reaktionsansatzes:

- 4 µl cDNA (aus RT)
- 33 µl Wasser
- 5 µl 10 x cDNA PCR-Puffer (Clontech, SMART PCR cDNA Synthesekit)
- 6 µl Nukleotidmix
- für die Markierung mit Fluorescein ist der PCR Fluorescein Labelling Mix von Boehringer Mannheim geeignet;
- für CY5 oder CY3 wird folgendes Protokoll verwendet:

Verbindung	5 x konz. [nM]	Konzentration der Stammlösung [nM]	zuzugebendes Volumen [μl]
CY5-dUTP oder CY3-dUTP	0,5	1	25
dTTP	1	100	0,5
dATP	2,5	100	1,25
dCTP	2,5	100	1,25
dGTP	2,5	100	1,25
Wasser	/	/	20,75
Σ			50

- 1 μl PCR-Primer (10 μM, Clontech, SMART PCR cDNA Synthesekit)
- 1 μl 50 x Advantage cDNA-Polymerasemix (Clontech, SMART PCR cDNA Synthesekit)

Das Reaktionsvolumen beträgt insgesamt 50 μl. Die Reaktion wird in folgenden Zyklen durchgeführt: 95°C 1 min; 24 Zyklen: 95°C 15 s, 65°C 30 s und 68°C 8 min.

### Beispiel 8 Hybridisierung

Die gereinigte markierte Sonde (PCR-Produkt gemäß Beispiel 7, zweimal über Microcon Membranen, vorzugsweise Microcon 100 Membranen gereinigt) wurde in 1 x Annealing Puffer (1 M Tris HCl pH 8,0; 100 mM MgCl<sub>2</sub> oder 5 x SSC) in der jeweils gewünschten Konzentration (vorzugsweise so hoch wie möglich, z.B. 25 mM) gelöst. 10 bis 25 μl der Lösung wurden auf die in Beispiel 4 hergestellten Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Objektträger versiegelt, beispielsweise durch Abdecken mit einem weiteren ggf. hydrophobisierten (z.B. mit Trimethylchlorsilan) Objektträger. Nach 1 h erfolgte eine Denaturierung bei 80°C für mindestens 3 min und dann eine Inkubation bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur für 4 bis 36 h. Bevorzugte Bedingungen für die Hybridisierung mit

Oligonukleotiden waren 4°C für 8 bis 12 h unter Verwendung von Lösungen mit einer Konzentration von 2 µM Oligonukleotid in 100 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Dann wurde in 0,1 x SSC bei einer für die jeweils gewünschte Stringenz ausreichenden Temperatur gewaschen.

5

Der Nachweis der Fluoreszenzsignale erfolgte unter Verwendung eines Fuji FLA2000 Fluoscanner oder eines Fluoreszenzmikroskops und einer CCD Kamera.

10

Bei Verwendung zweier unterschiedlicher kovalent gebundener Primer (18-mere) mit verschiedenen Sequenzen, die mit einer Lösung eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids, das zu einem der gebundenen Moleküle vollständig und zu dem anderen teilweise (30%) komplementär war, konnte eine spezifische Hybridisierung ausschließlich mit dem vollständig komplementären Primer gezeigt werden.

15

Um die Wiederverwendbarkeit der beschichteten Festphasen zu testen, wurden die hybridisierten DNA-Moleküle (Oligonukleotide) durch Waschen bei 90 °C für 20 - 60 min unter leichtem Schütteln dehybridisiert. Die

20

Dehybridisierung wurde durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Nach vollständiger Dehybridisierung zeigten die Chips kein Fluoreszenzsignal mehr und konnten für eine zweite Hybridisierungsrunde verwendet werden. Eine Wiederverwendung war mehrere Male (mindestens fünfmal) ohne signifikanten Verlust gebundener DNA-Moleküle möglich.

25

### Beispiel 9 Nichtkovalente Immobilisierung

Die Bindung von DNA an die Festphase muß nicht definiert kovalent sein, sondern kann auch mit N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan erfolgen. Dazu wurden die zu modifizierenden Gläser einer 0,01-3%igen Lösung von N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan in Methanol:Wasser (= 1:1) ausgesetzt und ca. 1-3 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln

30

reagieren gelassen. Danach wurden die Gläser ausgiebig mit Methanol, Wasser und wieder Methanol gewaschen. Überschüssiges Methanol wurde durch Zentrifugation bei 500 U/min entfernt und die Gläser bei 130°C ca. 3 h in einem Ofen reagieren gelassen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die aufzubringende DNA (mit oder ohne 5'-Aminomodifikation) in Wasser oder Puffer gelöst aufgetropft. Die Anbindung der DNA an das modifizierte Glas erfolgte durch einstündiges Einwirken in gesättigter Wasseratmosphäre bei ca. 40 bis 50°C und anschließendes Backen bei 110°C für 10 bis 15 Minuten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur waren die so gefertigten DNA-Arrays für die weitere Vorgehensweise (Denaturierung, Hybridisierung, Waschen und Detektion) einsatzbereit.

### Patentansprüche

5 1. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase umfassend die Schritte:

- 10 (a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen Festphasen, die auf mindestens einem Teil ihrer Oberfläche mit Aminogruppen reaktive Gruppen ausgewählt aus Halogenid-, Aldehyd-, Epoxid-, Isocyanat- und Isothiocyanatgruppen enthält,
- (b) Bereitstellen eines Biopolymers mit einer reaktiven Aminogruppe und
- 15 (c) kovalentes Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase.

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der Festphase ausgewählt werden aus Arylhalogenid-, Aldehyd- und  
20 Isocyanatgruppen.

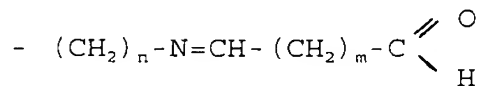
25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Festphase ausgewählt wird aus Silicium, Siliciumdioxid, Silicatgläsern und Silicium/Siliciumdioxid.

30 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Festphase eine Struktur der allgemeinen Formel (I) umfaßt:

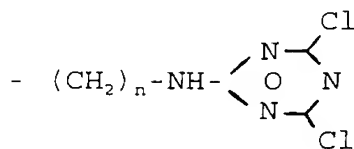
worin Z Silicium, Siliciumdioxid, ein Silicatglas oder eine oxidierte Siliciumschicht bedeutet,

R -  $(\text{CH}_2)_n\text{-Cl}$

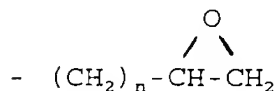
5



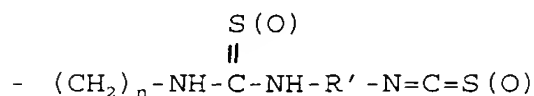
10



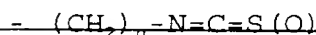
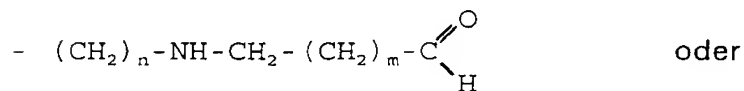
20



25



30



bedeutet,

R' einen Alkylen- oder Arylenrest, insbesondere einen 1,4-Phenylrest bedeutet, und

n und m jeweils eine positive ganze Zahl vorzugsweise von 1 bis 20 bedeuten.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß die Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloge.

6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß aminomodifizierte Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloge mit  
einer Struktur der allgemeinen Formel (II) verwendet werden:

5



worin

- $R^1$  Wasserstoff oder eine  $C_1$ - $C_6$ -Alkylgruppe bedeutet,  
NS eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA oder ein  
Oligonukleotid, oder ein Nukleinsäureanalogon bedeutet,  
X eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe bedeutet und  
X mit dem 5'- oder/und 3'-terminalen Baustein von NS  
verknüpft ist.

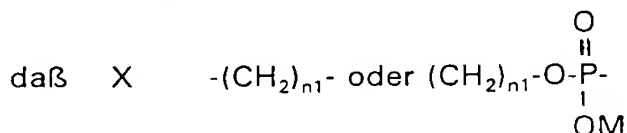
15

7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß NS eine Nukleinsäure ist und  $R^1NH-X$  über das 5'-C-Atom des 5'-  
terminalen Zuckerrests, insbesondere eines Deoxyriboserests, mit NS  
verknüpft ist.

20

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,

25



bedeutet, worin

- $n1$  eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20,  
z.B. 3, 6 oder 12 bedeutet und

30

- M Wasserstoff oder ein Kation bedeutet.



9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß aminomodifizierte Nukleinsäuren durch enzymatische Synthese  
und anschließende ortsspezifische Spaltung an der Aminogruppe  
erzeugt werden.

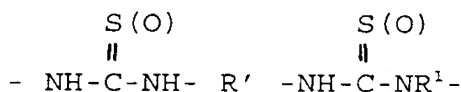
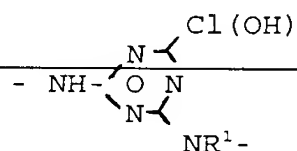
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Festphase nach Immobilisierung des Biopolymers eine  
Struktur der allgemeinen Formel (III) umfaßt:



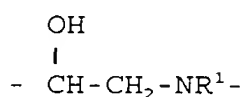
worin Z eine Festphase bedeutet,

$R^2$  -  $(CH_2)_{n2}$ - bedeutet,

Y -  $N=CH-(CH_2)_m-CH=N-$ ,  
-  $NH-CH_2-(CH_2)_m-CH_2-NR^1-$ ,  
-  $NR^1-$ ,



oder



bedeutet,  $R'$ ,  $R^1$ , NS und X wie in Anspruch 6 definiert sind,  
 $n2$  eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20,  
z.B. 1, 3, 6 oder 12 bedeutet, und  
m wie in Anspruch 4 definiert ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Biopolymere in einer Array-Struktur auf die Festphase  
aufgebracht werden.

5

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das Aufbringen der Biopolymere durch Mikroinjektionspipetten  
erfolgt.

13. Festphase mit immobilisierten Biopolymeren umfassend eine Struktur  
der allgemeinen Formel (III) wie in Anspruch 10 definiert.

14. Festphase nach Anspruch 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine Array-Struktur mit mehreren unterschiedlichen  
Biopolymeren auf jeweils separaten Flächenbereichen enthält.

15

15. Festphase nach Anspruch 13 oder 14,

20

**dadurch gekennzeichnet,**

daß die einzelnen Flächenbereiche einen Durchmesser von etwa 0,5  
bis 10  $\mu\text{m}$  aufweisen.

16. Verwendung einer Festphase hergestellt nach einem der Ansprüche  
1 bis 12 oder einer Festphase nach einem der Ansprüche 13 bis 15  
zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den  
immobilisierten Biopolymeren und freien Biopolymeren.

25

17. Verwendung nach Anspruch 16,  
**dadurch gekennzeichnet,**

30

daß die freien Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge, peptidischen Nukleinsäuren (PNA), Peptiden, Polypeptiden, Lipiden und Kohlenhydraten.

- 5      18.    Verwendung nach Anspruch 16 oder 17,  
         **dadurch gekennzeichnet,**

daß die immobilisierten Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge und PNA und eine auf eine Hybridisierung basierende Wechselwirkung mit freien Biopolymeren untersucht wird.

- 10      19.    Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18 zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

- 15      20.    Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18 für Untersuchungen der Expression von Genen, der Funktion von Genen und des Metabolismus.

- 20      21.    Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen von auf einer  
         ~~Hybridisierung basierenden Wechselwirkungen von immobilisierten~~  
         und freien Biopolymeren, umfassend eine Festphase hergestellt nach  
         einem der Ansprüche 1 bis 12 oder eine Festphase nach einem der  
         Ansprüche 14 bis 16, mindestens eine markierte  
         Hybridisierungssonde, einen Hybridisierungspuffer und eine  
25      Hybridisierungskammer gegebenenfalls verbunden mit einer  
         Pumpvorrichtung und einer Temperaturkontrollvorrichtung.

- 30      22.    Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 21 in einem Verfahren zum Nachweis der Bindung von Hybridisierungssonden an immobilisierte Biopolymere.

23. Verwendung nach Anspruch 22 umfassend das Ablösen gebundener Hybridisierungssonden von der Festphase und den Einsatz der Vorrichtung für weitere Hybridisierungszyklen.

5 24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß Hybridisierungssonden verwendet werden, die 5'-aminomodifizierte Nukleotidbausteine enthalten.

10 25. Verwendung nach Anspruch 24,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß gebundene Hybridisierungssonden einer ortsspezifischen Spaltung an der P-N-Bindung der 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteine unterzogen und dann von den auf der Festphase immobilisierten Biopolymeren abgelöst werden.

26. Verfahren zur gleichzeitigen Amplifikation und Markierung von cDNA-Molekülen umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen von RNA-Molekülen,

20 ~~(b) ~~Reverses Transkribieren der RNA-Moleküle ohne Einführung~~~~  
~~von Markierungsgruppen in die resultierenden cDNA-Moleküle,~~

(c) gleichzeitiges Markieren und Amplifizieren der cDNA-Moleküle unter Verwendung von mit markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten und

25 (d) gegebenenfalls Aufreinigen der resultierenden markierten cDNA-Moleküle.

27. Verfahren nach Anspruch 26,  
**dadurch gekennzeichnet,**

30 daß die in Schritt (a) bereitgestellten RNA-Moleküle eine Population unterschiedlicher RNA-Moleküle, z.B. Gesamt-RNA, mRNA oder andere RNA-Fractionen aus einer biologischen Probe enthalten.

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß in Schritt (c) mit Fluoreszenzgruppen, die vorzugsweise  
ausgewählt werden aus Fluorescein, CY3 und CY5, markierte  
Deoxyribonukleosidtriphosphate verwendet werden.

5

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 28,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß während des Amplifizierens 5'-aminomodifizierte  
Nukleotidbausteine in die cDNA-Moleküle eingebaut werden.

10

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß in Schritt (c) mindestens einer der für die Amplifikation  
verwendeten Primer ein 5'-aminomodifizierter Primer ist.

15

31. Verfahren zu Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase  
umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen

20

~~Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen~~

Festphasen, die mindestens auf einem Teil ihrer Oberfläche  
Aminogruppen enthält,

(b) Bereitstellen eines Biopolymers und

(c) Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase, wobei die  
Aminogruppen enthaltende Festphase stabile kovalente oder  
nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Biopolymer  
ausbildet.

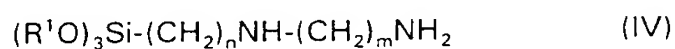
25

32. Verfahren nach Anspruch 31,  
**dadurch gekennzeichnet,**

30

daß die Aminogruppen der Festphase durch Behandlung der Festphasenoberfläche mit einer Aminosilylverbindung erzeugt werden.

- 5 33. Verfahren nach Anspruch 32,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Aminosilylverbindung eine Struktur der allgemeinen Formel IV aufweist:



wobei  $R^1$  Wasserstoff oder eine  $C_1$ - $C_3$ -Alkylgruppe, vorzugsweise einen Methylrest, bedeutet und n und m wie in Anspruch 4 definiert sind.

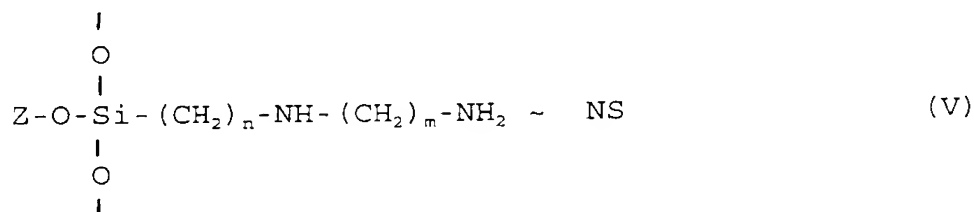
15

34. Verfahren nach Anspruch 33,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man als Verbindung der Formel IV N-(6-Aminohexyl)-aminopropyltrimethoxysilan verwendet.

20

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 34,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Festphase nach Immobilisierung des Biopolymers eine Struktur der allgemeinen Formel (V) umfaßt:

25



30

wobei NS, Z, n und m wie in Anspruch 10 definiert sind und  $\sim$  eine kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkung darstellt.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Biopolymere in einer Array-Struktur auf die Festphase  
aufgebracht werden.

5

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das Aufbringen der Biopolymere durch Mikroinjektionspipetten  
erfolgt.

10

38. Festphase mit immobilisierten Biopolymeren umfassend eine Struktur  
der allgemeinen Formel (V) wie in Anspruch 35 definiert.

15

39. Festphase nach Anspruch 38,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine Array-Struktur mit mehreren unterschiedlichen  
Biopolymeren auf jeweils separaten Flächenbereichen enthält.

40. Festphase nach Anspruch 38 oder 39,

20

---

**dadurch gekennzeichnet,**

daß die einzelnen Flächenbereiche einen Durchmesser von etwa 0,5  
bis 10  $\mu\text{m}$  aufweisen.

25

41. Verfahren zur Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren  
aufgrund ihrer Basensequenz,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß einer der die doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente bildenden  
Nukleinsäurestränge mindestens einen 5'-aminomodifizierten  
Nukleotidbaustein enthält.

30

42. Verfahren nach Anspruch 41,  
**dadurch gekennzeichnet,**

daß die Auftrennung ein partielles Aufschmelzen der Nukleinsäuredoppelstränge durch einen Temperaturgradienten umfaßt.

- 5 43. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42 zur Mutationsanalyse.
-



## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von  
5 Biopolymeren, insbesondere von Nukleinsäuren, an eine Festphase. Dabei  
werden kovalente Bindungen zwischen primären oder/und sekundären  
Amingruppen der Biopolymere und mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der  
Festphase geschlossen.

10

sh/ANM/20349PDE1 31. März 2000

---

